Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 333-347

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد- تیر ۱۴۰۲ ص. ۳۴۷-۳۳۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

# Evaluation the Effect of Wheat Germ Fermentation Using Yeast and Lactic Acid Bacteria on the Bioactive Compounds

E. Bayat asl[1], M. Mousavinasab[2], M. Fazaeli[3]*

Received: 2021.12.18
Revised: 2022.05.11
Accepted: 2022.05.15
Available Online: 2022.05.15

**How to cite this article:**
Bayat asl, E., Mousavinasab, M., & Fazaeli, M. (2023). Evaluation the effect of wheat germ fermentation using yeast and lactic acid bacteria on the bioactive compounds. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(2), 333-347. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74066.1123

## Introduction

Wheat germ is a valuable nutritional supplement and a by-product of the flour milling industry used for animal feed and oil extraction. Quinone compounds found in wheat germ have anti-cancer properties that are abundantly found in wheat germ. The aim of this study was to investigate the effect of fermentation conditions on the bioactive compounds in wheat germ with anti-cancer properties. For this purpose, the *Saccharomyces cerevisiae* 5022 and *Lactobacillus plantarum* strain 1058 were used for fermentation of wheat germ under different pH levels (4.5, 6, and 7.5) over different time (24, 48, and 72h). Response Surface Methodology was used to find the optimal fermentation conditions and to investigate the effects of above-mentioned conditions on DPPH radical scavenging activity, total phenolics and dimethoxy benzoquinone (DMBQ) content. Moreover, the amounts of bio-peptides and gamma aminobutric acid (GABA) were also determined under optimum conditions.

## Materials and Methods

To accomplish the fermentation process, 10 g of wheat germ was suspended in 200 mL of sodium phosphate buffer solution. Bacterial and yeast cells were then separated from the culture medium by a centrifugation at 6,000×g for 5 min at room temperature. The harvested cells were then washed with sterile phosphate buffer multiple times, resuspended in water to achieve a cell population of 108 CFU/mL, and finally homogenized using a vortex unit. The yeast and bacterial cells were incubated at 28° C and 37° C, respectively, for 24, 48, and 72 h at pH levels of 4.5, 6.0, and 7.5. Upon the completion of each fermentation process, the obtained samples were lyophilized. Total phenolic content (TPC) was measured using the method adapted by Liu *et al*. (2017). Briefly, the Folin-Ciocalteu phenol reagent was diluted ten times using distilled water. Subsequently, 0.1 mL of the extract was mixed with 0.75 mL of the diluted reagent. After 10 min, 0.75 mL sodium carbonate solution (2% w/v) was added to the mixture and vortexed. The absorbance was measured at 765 nm by a spectrophotometer. The antioxidant activity of fermented wheat germs was assessed using the free radical scavenging activity of the samples evaluated through a DPPH radical assay. Briefly, 2 mL of wheat germ extract was diluted with 100 mL 90% methanol aqueous solution. The methanol extract was then mixed with 4 mL of DPPH stock solution. The tube was subsequently kept in the dark for 45 min. The absorbance of each sample was then read using a spectrophotometer at 517 nm (Adedoyin et al., 2013). Dimethoxy benzoquinone (DMBQ) content was measured by an HPLC system. Briefly, 10 g of lyophilized wheat germ sample was dissolved in 250 mL of distilled water and extracted three times by shaking with 200 mL of chloroform. The chloroform layers were collected, washed three times with distilled water, and exposed to sodium sulfate solution to induce drying of the sample. The filtrate was then evaporated using a vacuum evaporator at 30° C to achieve a stable dry material. The dried sample was thereafter

1 and 3- M.Sc. and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, respevtively.
2- Professor, Aquatic Research Group, Faculty of Agriculture Shiraz University, Shiraz, Iran
(*- Corresponding Author Email: fazaeli@shirazu.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74066.1123

dissolved in the mobile phase and injected into the HPLC column to determine the DMBQ content. The HPLC system was equipped with a C-18 column and a UV detector operating at 245 nm. The mobile phase consisted of 20% acetonitrile-80% water (v/v) mixture at a flow rate of 0.5 mL/min and a temperature of 25° C.

## Results and Conclusion

The highest biological activity was found when fermentation proceeded by *L. plantarum* under pH 6 for 48 h. Under these optimal conditions, total phenol content (3.33 mg of GAE/g), free DPPH radical scavenging (86.49%), dimethoxy benzoquinone content (DMBQ) (0.56 mg/g), peptide content (607 µg/mL) and gamma aminobutyric acid (GABA) (19983.88 mg/kg) were significantly higher than those of raw non-fermented samples. During the fermentation process, increasing the pH levels led to enhancement of antioxidant activity, total phenolic and DMBQ contents up to 48 h followed by a decline. Also, the fermentation time had a positive effect in the amount of the antioxidant activity, while it allowed an increased followed by a decrease in the contents of total phenolic and DMBQ. These findings underscore the importance of fermentation conditions of wheat germ by *L. plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* and can potentially serve as a promising way for the development of valuable products with anti-cancer and antioxidant functions.

**Keywords:** Gamma Aminobutyric Acid, Quinone, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 333-347

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲ ص. ۳۴۷-۳۳۳

**مقاله پژوهشی**

# ارزیابی تأثیر تخمیر جوانه گندم با استفاده از مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک بر میزان ترکیبات زیست‌فعال

**الناز بیات اصل[۱]- مرضیه موسوی نسب[۲]- محبوبه فضایلی[۳]***

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵

## چکیده

جوانه‌ی گندم یک مکمل غذایی پر ارزش و یک محصول جانبی کارخانه‌ی آرد است که برای تامین غذای دام و تولید روغن مورد استفاده قرار می‌گیرد. ترکیبات کوئینون موجود در جوانه‌ی گندم دارای خاصیت ضد سرطانی است که به وفور در جوانه‌ی گندم یافت می‌شود. هدف از این پژوهش، مطالعه و بررسی اثر تخمیر بر ترکیبات زیست فعال موجود در جوانه‌ی گندم با خواص ضدسرطانی است. در این مطالعه تخمیر جوانه‌ی گندم توسط مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* 5052 و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1058 در pH های معادل ۴/۵، ۶ و ۷/۵ و زمان‌های۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفت و از روش سطح پاسخ جهت یافتن شرایط بهینه تخمیر استفاده شد و جوانه‌ی گندم تخمیری بعد از خشک شدن از لحاظ خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ترکیبات زیست فعال مورد بررسی قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت تخمیر میزان ترکیبات زیست فعال به بالاترین میزان خود رسید و در ادامه روند کاهش میزان این ترکیبات مشاهده شد و در ۷۲ ساعت به کمترین میزان رسیدند. به عنوان مثال میزان ترکیبات فنولی و دی متوکسی بنزوکوئینون نمونه‌های جوانه گندم تخمیر شده با مخمر در pH معادل ۶ در زمان‌های تخمیر ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب عبارت بودند از: ۲/۴۶، ۲/۹۰ و ۲/۷۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم و ۰/۰۷۶، ۰/۲۳۰ و ۰/۱۷۰ میلی گرم در گرم. شرایط بهینه‌ی به دست آمده در این مطالعه تخمیر جوانه گندم به وسیله باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1058 در مدت زمان ۴۸ ساعت و pH معادل ۶ بدست آمد. در شرایط بهینه‌ی بدست آمده میزان فنول کل، ربایندگی رادیکال آزاد DPPH و میزان دی متوکسی بنزوکوئینون به ترتیب ۳/۳۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم، ۸۶/۴۹ درصد و ۰/۵۶ میلی گرم در گرم بدست آمد.

**واژه‌های کلیدی:** *ساکارومایسس سرویسیه*، کوئینون، گاماآمینوبوتریک اسید، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

## مقدمه

گندم بعد از برنج دومین غله‌ی پرمصرف انسان است. این گیاه یکی از اصلی ترین محصولات غذایی است که به دلیل داشتن کالری زیاد بیش از یک سوم از جمعیت جهان آن را مصرف می کنند. گندم ابتدا در چین، هند، روسیه، ایالات متحده، فرانسه، کانادا، آلمان، پاکستان، استرالیا و اوکراین کشت می‌شد و میزان برداشت آن به ۷۶۰ میلیون تن در سال ۲۰۱۷ رسید (Babu *et al.*, 2018). دانه‌ی گندم از سه بخش اصلی آندوسپرم (۸۵ ٪)، سبوس (۱۳٪) و جوانه (۲٪) تشکیل شده است. از بین سه قسمت مذکور جوانه‌ی گندم یکی از پرارزش‌ترین مکمل‌های غذایی و یک محصول جانبی کارخانه‌ی تولید آرد است که برای تامین غذای دام و تولید روغن به کار می‌رود (Rizzello *et al.*, 2011).

جوانه‌ی گندم دارای بالاترین ارزش تغذیه‌ای و منبعی غنی از α توکوفرول، ویتامین‌های گروه B و E، فیبرهای رژیمی، مواد معدنی

۱ و ۳- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: fazaeli@shirazu.ac.ir)
۲- استاد، پژوهشکده فراوری آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74066.1123

مانند کلسیم، فسفر، روی، ید، سلنیوم و منیزیم و پروتئین‌های به طور غالب آلبومین و گلوبولین است و به طور کلی منبع بی‌نظیری از مواد مغذی می‌باشد که برای سلامتی بسیار مفیدند (Zhang *et al.*, 2017). جوانه‌ی گندم سرشار از اسیدآمینه‌های ضروری لیزین، متیونین و ترئونین است که در بسیاری از غلات کمبود آن‌ها دیده می‌شود، این اسیدهای آمینه بایستی از طریق جیره‌ی غذایی روزانه به بدن برسند در غیر این‌صورت عوارض کمبود آنها ظاهر می‌شود. گفتنی است ترکیب اسیدهای آمینه در پروتئین‌های جوانه‌ی گندم از لحاظ شیمیایی مشابه پروتئین‌های موجود در تخم‌مرغ است (Rizzello *et al.*, 2010). ترکیبات فعال زیستی موجود در جوانه‌ی گندم شامل فنولیک اسیدها، ساپونین ها، فلاونوئیدها، آلفا آمینوبوتیریک اسید (GABA)، کینون‌ها و پپتیدهای فعال زیستی هستند (Rizzello *et al.*, 2013). جوانه‌ی گندم همچنین دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده عمدتاً اسیدهای اولئیک، لینولئیک و α لینولنیک است (Zhu *et al.*, 2006).

با وجود تمام فوایدی که ذکر شد استفاده از جوانه‌ی گندم به دلیل داشتن فاکتورهای ضد تغذیه‌ای اسید فیتیک، رافینوز و آگلوتینین و ماندگاری کم به دلیل وجود اسیدهای چرب اشباع نشده و فعالیت زیاد آنزیم‌های لیپاز و لیپوکسیژناز هنوز چالش برانگیز است و استفاده‌ی غذایی اندکی برای انسان دارد. پسماند سالانه‌ی جوانه در دنیا ۲۵,۰۰۰,۰۰۰ تن ارزیابی شده است. با تکنیک‌های زیستی مثل تخمیر می‌توان ارزش بیولوژیکی جوانه را افزایش داد و دسترسی به ترکیبات زیست فعال آن را زیاد کرد (Zhang *et al.*, 2015).

مواد غذایی تخمیر شده در سراسر جهان حدود یک سوم رژیم غذایی را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌ها و ویتامین‌های موجود در غلات می‌توانند با تخمیر بهبود یابند (Kohajdov and Karovi, 2007). تخمیر ممکن است تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله میکروارگانیسم مورد استفاده، pH ، دما و زمان تخمیر قرار گیرد. شایان توجه است که انتخاب نوع میکروارگانیسم به کار رفته در فرایند تخمیر بستگی به محصول نهایی مورد نظر دارد همچنین فاکتور pH از مهمترین پارامترهای محیطی است که بر تخمیر مواد غذایی تأثیر می گذارد و با رشد میکروبی در طول تخمیر ارتباط نزدیکی دارد. تغییرات دما نیز بر روند فرآیند تخمیر بسیار موثر است و حفظ دمای مطلوب در طول تخمیر منجر به رشد مناسب میکروارگانیسم و فعالیت آنزیمی می‌گردد (Hur *et al.*, 2014). از این رو به دست آوردن شرایط بهینه فرایند تخمیر از اهمیت بسیاری برخوردار است.

در مطالعات متعددی اشاره شده که تخمیر جوانه‌ی گندم با مخمر ساکارومایسس سرویزیه با نام تجاری آومار دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی می‌باشد (Zhang *et al.*, 2015). در حال حاضر فرض بر این است که دو نوع کوئینون موجود در جوانه‌ی گندم یعنی متوکسی بنزوکوئینون و دی‌متوکسی بنزوکوئینون احتمالا مسئول برخی از خواص بیولوژیکی هستند (Rizzello *et al.*, 2013). تا به امروز بیش از ۲۰۰۰ نوع کوئینون طبیعی مانند آنتراکسینین ها، نفتاپوکینون ها و بنزوکینون ها شناخته شده است و مشخص گردیده بین غذاهای گیاهی جوانه‌ی گندم احتمالاً بهترین منبع متوکسی بنزو کوئینون و دی‌متوکسی بنزوکوئینون می‌باشد (Kim *et al.*, 2010).

در مطالعاتی از ژنگ و همکاران (Zheng *et al.*, 2016) که به بررسی بهینه‌سازی فرآیند تخمیر جوانه‌ی گندم با مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* RC212 به منظور افزایش تولید فلاونوئیدها و بنزوکوئینون بر اساس پارامترهای سرعت، دما، زمان و pH پرداختند، نتایج بدست آمده نشان دهنده‌ی بیشترین میزان متوکسی بنزوکوئینون و دی‌متوکسی بنزوکوئینون در مقابل پایین‌ترین مقدار فلاونوئیدها بود و این موضوع رابطه‌ی عکسی با میزان متابولیسم مخمر داشت یعنی افزایش متابولیسم *ساکاومایسس سرویسیه* منجر به کاهش فلاونوئید در طول تخمیر شد (Zheng *et al.*, 2016). عصاره‌ی جوانه‌ی گندم تخمیر شده با مخمر حاوی صدها تا هزاران مولکول مختلف می‌باشد و علاقه به تخمیر جوانه‌ی گندم با استفاده از مخمر و باکتری‌های اسید لاکتیک روزبه‌روز در حال افزایش است (Zhang *et al.*, 2015).

در مطالعه‌ای دیگر از ژنگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2015) تاثیرات عصاره‌ی جوانه‌ی گندم تخمیری با باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* dy-1 بر سلول سرطانی HT-29 مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد سرطانی عصاره‌ی جوانه‌ی گندم امکان دارد علاوه بر کوئینون‌ها به عوامل دیگری نیز وابسته باشد (Zhang *et al.*, 2015). پپتیدهای زیست فعالی که در محصولات مختلف از جمله غلات، حبوبات، شیر، گوشت، تخم مرغ و موجودات دریایی مختلف وجود دارد می‌تواند عاملی بسیار مهم و موثر در فعالیت‌های زیستی از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی باشد (Rizzello *et al.*, 2013). تخمیر در تولید پپتیدهای کوچکتر بسیار موثر است و افزایش فنول‌ها و پپتیدهای زیست فعال در کنار هم منجر به افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی می‌شود (Liu *et al.*, 2017).

اولین هدف از این پژوهش، تخمیر جوانه‌ی گندم در زمان‌ها و pHهای متفاوت با استفاده از مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* PTCC 5052 و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 جهت به دست آوردن شرایط بهینه به منظور افزایش ترکیبات فعال زیستی و

دومین هدف بررسی میزان ترکیبات زیست فعال در عصاره‌ی جوانه‌ی گندم تخمیر شده و خاصیت آنتی اکسیدانی آنها می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد اولیه‌ی مورد استفاده

جوانه‌ی گندم رقم شیراز از کارخانه‌ی آرد خوشه‌ی شیراز تهیه شد و به منظور جلوگیری از اکسید شدن و تغییرات نامطلوب در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: هیدروکسید سدیم (سود سوزآور)، سدیم کلرید، استونیتریل، کلروفرم، محیط کشت YGC ( Yeast Glucose Chloramphenicol) و MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) و محصول شرکت مرک، آلمان می‌باشند. اتانول، متانول و هگزان نرمال محصول شرکت آرمان سینا، ایران می‌باشند و استاندارد دی متوکسی بنزوکوئینون نیز از شرکت سیگما تهیه شد. میکروارگانیسم های مورد استفاده در تحقیق حاضر مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* PTCC 5052 و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

### تخمیر جوانه‌ی گندم

در این تحقیق سیستم تخمیر از نوع تخمیر غوطه وری می باشد. مخمر*ساکارومایسس سرویسیه* در محیط کشت YGC تحت دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری و فعالسازی گردید. باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به مدت ۴۸ ساعت در انکوبه ۳۷ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری و فعالسازی و سپس تعداد سلول میکروارگانیسم با روش مک فارلند تعیین گردید. ۱۰ گرم جوانه گندم با ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات سدیم (۰/۰۵ مولار) استریل مخلوط شد. فرایند تخمیر با مخمر و باکتری به ترتیب در دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سلسیوس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در pHهای معادل ۴/۵، ۶/۰ و ۷/۵ صورت گرفت. پس از اتمام فرآیند تخمیر، نمونه‌ها با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای آنالیزهای شیمیایی بیشتر نگهداری شدند.

### خصوصیات فیزیکوشیمیایی

اندازه‌گیری مقدار رطوبت نمونه‌ها طبق روش استاندارد (AACC) به شماره ۱۹-۴۴ ، خاکستر با استفاده از روش استاندارد (AACC) به شماره ۰۸-۰۱ ، مقدار چربی با استفاده از روش سوکسله طبق روش استاندارد (AACC) به شماره ۱۰-۳۰ و پروتئین از روش میکروکلدال طبق استاندارد (AACC) به شماره ۱۰-۴۶ انجام شد (AACC, 2000).

### میزان فنول کل

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی کل مطابق روش ارائه شده توسط لو و همکاران (Lu *et al.*, 2012) انجام شد. برای عصاره‌گیری، ۲ گرم از نمونه در متانول ۹۰ درصد حل شد و در سانتریفیوژ (شتاب ۶۰۰۰×g به مدت۳۰ دقیقه) قرار گرفت. عصاره به دست آمده در دمای ۴- درجه سلسیوس نگهداری شد. در این روش ابتدا معرف فولین سیوکالتیو به وسیله‌ی آب مقطر به میزان ۱۰ برابر رقیق شد سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره با ۰/۷۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو رقیق شده، مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه گذاری شد. سپس ۰/۷۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات ۲ درصد (وزنی/حجمی) به مخلوط اضافه شده و مخلوط در تاریکی و به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شد و پس از آن میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان ترکیبات فنولی کل با استفاده از استاندارد گالیک‌اسید (۰/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) تعیین و به صورت میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید در گرم نمونه گزارش شد (Lu *et al.*, 2012).

### ربایندگی رادیکال آزاد DPPH

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. ابتدا در حلال متانول ۹۰ درصد، ۲ میلی‌لیتر از عصاره‌های مختلف استخراج شده جوانه‌ی گندم رقیق سازی گردید. سپس محلول DPPH به غلظت ۴ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (متانول ۹۰ درصد) را تهیه کرده و به هر ۲ میلی‌لیتر از محلول عصاره ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH اضافه شد و بعد از به‌همزدن، لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. در نمونه‌ی کنترل، به جای محلول عصاره از حلال استفاده شد. پس از گذشت این زمان با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب محلول قرائت شد (Adedoyin *et al.*, 2013). درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH طبق معادله زیر محاسبه گردید:

$$RSA = \{(A_C - A_S)/A_C\} \times 100 \qquad (۱)$$

RSA: ربایندگی رادیکال آزاد DPPH (درصد)، $A_C$: جذب کنترل، $A_s$: جذب نمونه

### میزان دی متوکسی بنزوکوئینون (DMBQ)

اندازه‌گیری میزان دی متوکسی بنزوکوئینون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و پمپ ۱۰۰۰ (کنابر، آلمان) انجام

شد. ۱۰ گرم از نمونه‌ی خشک شده در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و با همزن در ۲۰۰ میلی‌لیترکلروفرم سه بار استخراج آن صورت گرفت. لایه‌های کلروفرم جمع‌آوری و سه بار شسته شد سپس در مجاورت سدیم سولفات ($Na_2So_4$) خشک گردید. ماده‌ی عبور کرده از فیلتر با استفاده از اواپراتور تحت خلاء در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس تبخیر گشت و به یک شرایط خشک و پایدار رسانده شد. ماده خشک در فاز متحرک حل شد و از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد و در ادامه با ستون (250×4.6 mm, 5µm) HPLC column Nucleodur C18 Pyramaid در طیف فرابنفش ۲۴۵ نانومتری با دتکتور UV اندازه‌گیری مقدار دی متوکسی بنزوکوئینون صورت گرفت. فاز متحرک شامل ۲۰ درصد استونیتریل و ۸۰ درصد آب و نرخ جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و دما ۲۵ درجه‌ی سلسیوس بود. استاندارد دی متوکسی بنزوکوئینون در فاز متحرک حل شد و به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت. شناسایی پیک‌ها با زمان بازدارندگی صورت گرفت. غلظت دی متوکسی بنزوکوئینون بر اساس استاندارد تهیه شده تعیین گردید. تمام اندازه گیری‌ها با سه بار تکرار انجام شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بیان گشت (Zheng *et al.*, 2017).

### میزان پپتید در شرایط بهینه

نخست ۰/۲۵ میلی‌لیتر از نمونه‌ی جوانه‌ی تخمیر شده توزین شد و با ۲ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۲۱۲۵ مولار با pH معادل ۸/۲ مخلوط شد سپس ۲ میلی‌لیتر محلول تری‌نیترو بنزوسولفوریک اسید (TNBS) ۰/۱ (حجمی/حجمی) به مخلوط افزوده گشت. مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس در تاریکی گرمخانه گذاری و سپس برای متوقف کردن واکنش، ۴ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به آن افزوده گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت گردید. برای تعیین میزان پپتید نمونه از اسیدآمینه‌ی L-Leuainy در غلظت‌های ۱/۲ – ۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به عنوان نمودار استاندارد استفاده شد (Rizzello *et al.*, 2010).

### میزان گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) در شرایط بهینه

۰/۲۵ گرم از نمونه جوانه‌ی تخمیر شده توزین و با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط گردید. این مخلوط تحت سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سلسیوس، ۱۰ دقیقه) قرار گرفت، مایع فوقانی برداشته شد و درون یک فالکون ریخته شد. مرحله‌ی بالا تکرار و مایع فوقانی جدید به مایع فوقانی قبلی اضافه گردید. حلال با استفاده از آون در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس تبخیر گشت. باقیمانده‌ی نمونه ماده‌ای چسبناک بود که در ته فالکون قرار داشت. ۱ میلی‌لیتر آب یون زدایی شده، رقیق گردید و محلول رقیق شده از فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، پمپ ۱۰۰۰ (کنابر، آلمان) و شناساگرIR میزان گابا اندازه‌گیری گردید. مراحل مذکور برای استانداردهای گابا تکرار شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از نمونه به ستون دستگاه (125×3mm,5µm) HPLC column Nucleodur C18 Pyramaid تزریق شد. دمای ستون ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و فاز ثابت ستون، آب و سرعت جریان ۰/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه بود (Donkor *et al.*, 2012).

## تحلیل آماری

در این مطالعه ۲۶ نمونه با شرایط تخمیر متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. جهت یافتن شرایط بهینه‌ی تخمیر از نرم‌افزار Design Expert (نسخه ۱۰)، روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی استفاده شد. شکل ها با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و نرم‌افزار اکسل (2016) رسم گردید. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از طرح آماری بلوک کاملا تصادفی و نرم‌افزار آماری بسته نرم‌افزاری (SPSS) استفاده گردید. آزمون ها در سه تکرار انجام شد سپس میانگین و انحراف معیار داده به دست آمد. مقایسه میانگین داده‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلاف بین آن‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

### ترکیب شیمیایی نمونه جوانه گندم

ترکیب شیمیایی اصلی نمونه جوانه گندم خام استفاده شده حاوی میانگین چربی۱۴/۰۰٪، پروتئین۳۲/۰۰٪، خاکستر۲/۵۰٪ و رطوبت۱۵/۵۰٪ بوده است.

### بدست آوردن شرایط بهینه‌ی تخمیر جوانه‌ی گندم

جهت یافتن شرایط بهینه از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی استفاده شد. آزمایش های مربوطه با توجه به نقاط تعریف شده در روش سطح پاسخ انجام گردید. جهت بهینه‌سازی شرایط تخمیر، اثر متغیرهای مستقل شامل pH ($X_1$) و زمان ($X_2$) در سه سطح و نوع میکروارگانیسم ($X_3$) در دو سطح مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون‌ها و نتایج حاصل از هر آزمون در جدول ۱ ارائه شده است. آزمون‌ها شامل ۲۶ تیمار بود. برای یافتن شرایط عملیاتی بهینه در ابتدا اهداف بهینه‌سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ و متغیرهای مستقل را تنظیم کرده و با استفاده از روش سطح پاسخ، بهترین پاسخ‌ها بدست آمد.

جدول ۱- نقاط مشخص شده با طرح مرکب مرکزی جهت بررسی ویژگی‌های جوانه گندم تخمیر شده

**Table 1- The points marked with the central composite design to investigate the characteristics of the fermented wheat germ**

| نمونه Sample | pH | زمان[۱] Time | نوع میکروارگانیسم Microorganism Type | TPC[2] | RSA[3] | DMBQ[4] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 7.5 | 24 | مخمر Yeast | 1.80 | 50.01 | 0.069 |
| 2 | 7.5 | 48 | باکتری Bacteria | 2.43 | 78.13 | 0.210 |
| 3 | 7.5 | 72 | باکتری Bacteria | 2.05 | 82.37 | 0.160 |
| 4 | 7.5 | 72 | مخمر Yeast | 2.33 | 71.01 | 0.120 |
| 5 | 7.5 | 48 | مخمر Yeast | 2.76 | 65.09 | 0.200 |
| 6 | 6.0 | 48 | باکتری Bacteria | 2.89 | 65.82 | 0.520 |
| 7 | 6.0 | 24 | باکتری Bacteria | 2.75 | 77.78 | 0.098 |
| 8 | 4.5 | 48 | مخمر Yeast | 2.53 | 77.53 | 0.150 |
| 9 | 4.5 | 24 | باکتری Bacteria | 1.83 | 59.49 | 0.088 |
| 10 | 6.0 | 24 | مخمر Yeast | 2.46 | 75.44 | 0.076 |
| 11 | 6.0 | 72 | باکتری Bacteria | 3.05 | 89.15 | 0.360 |
| 12 | 4.5 | 72 | باکتری Bacteria | 2.26 | 80.19 | 0.210 |
| 13 | 6.0 | 48 | باکتری Bacteria | 2.95 | 83.24 | 0.530 |
| 14 | 4.5 | 72 | مخمر Yeast | 2.33 | 82.77 | 0.084 |
| 15 | 7.5 | 24 | باکتری Bacteria | 1.64 | 61.08 | 0.079 |
| 16 | 6.0 | 48 | باکتری Bacteria | 3.41 | 85.64 | 0.600 |
| 17 | 4.5 | 48 | باکتری Bacteria | 2.54 | 75.85 | 0.400 |
| 18 | 6.0 | 48 | باکتری Bacteria | 3.62 | 86.88 | 0.620 |
| 10 | 6.0 | 72 | مخمر Yeast | 2.75 | 87.27 | 0.170 |
| 20 | 6.0 | 48 | مخمر Yeast | 2.90 | 80.19 | 0.230 |
| 21 | 4.5 | 24 | مخمر Yeast | 1.59 | 61.08 | 0.065 |
| 22 | 6.0 | 48 | مخمر Yeast | 3.45 | 85.00 | 0.350 |
| 23 | 6.0 | 48 | مخمر Yeast | 3.10 | 81.80 | 0.250 |
| 24 | 6.0 | 48 | مخمر Yeast | 3.20 | 82.34 | 0.270 |
| 25 | 6.0 | 48 | مخمر Yeast | 3.34 | 85.73 | 0.380 |
| 26 | 6.0 | 48 | باکتری Bacteria | 3.99 | 88.95 | 0.640 |

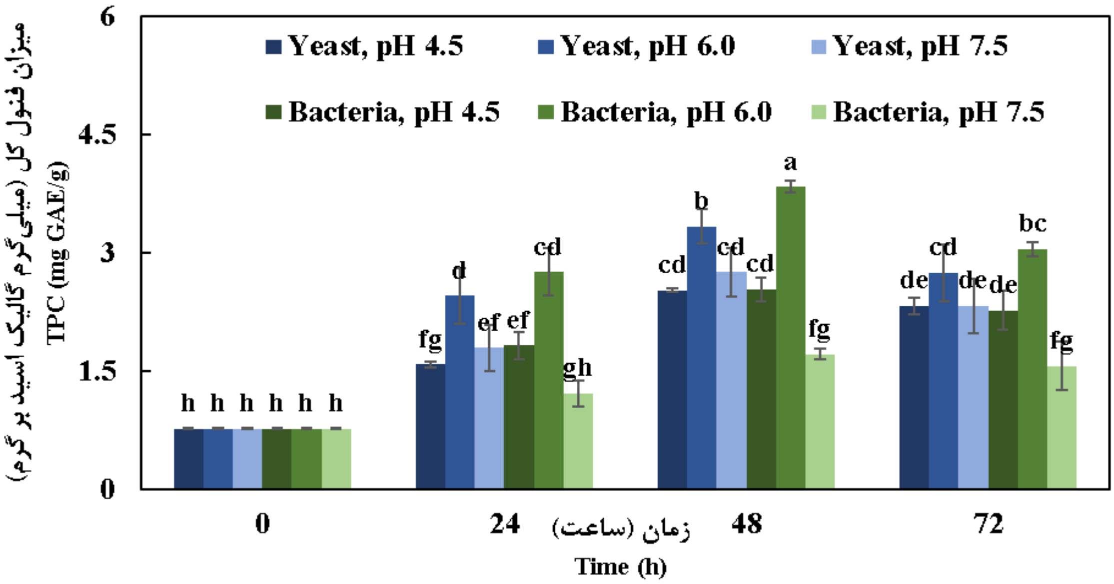
[۱] برحسب ساعت؛ [۲] میزان فنول کل برحسب میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم؛ [۳] ربایندگی رادیکال آزاد DPPH بر حسب درصد؛ [۴] دی متوکسی بنزوکوئینون بر حسب میلی گرم در گرم

[1] by the hour; [2] The amount of total phenol in milligrams equivalent to gallic acid per gram; [3] DPPH free radical scavenging in percentage; [4] Dimethoxybenzoquinone in mg/g

تنظیمات اعمال شده برای بهینه‌سازی شامل حداکثر شدن میزان فنول کل، حداکثر شدن درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH و حداکثر شدن میزان دی متوکسی بنزوکوئینون بود. شرایط بهینه‌ی تخمیر جوانه‌ی گندم تخمیر شده توسط باکتری در pH برابر با ۶ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت با مطلوبیت ۰/۸۳۲ بدست آمد. در این شرایط میزان فنول کل، ربایندگی رادیکال آزاد DPPH و میزان دی متوکسی بنزوکوئینون به ترتیب ۳/۳۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم، ۸۶/۴۹ درصد و ۰/۵۶ میلی گرم در گرم بدست آمد.

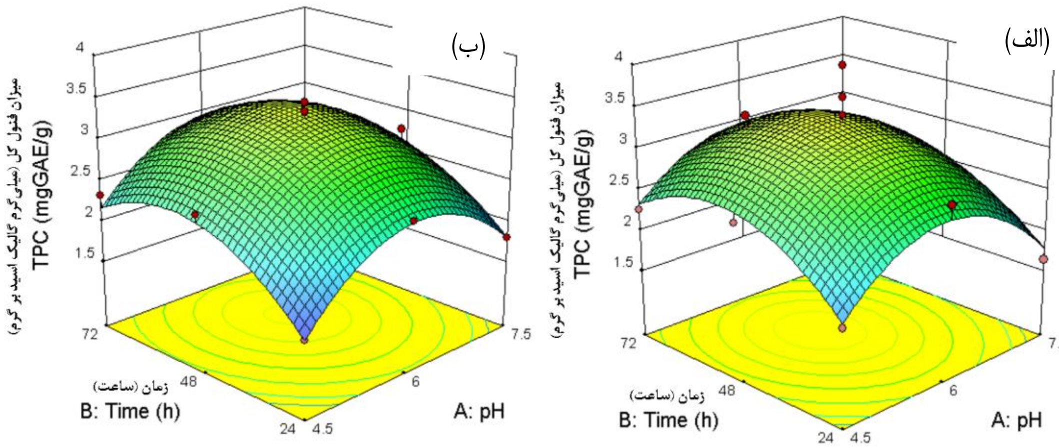
### میزان فنول کل

تغییرات میزان فنول کل در جوانه‌ی گندم تخمیر شده توسط مخمر و باکتری در شکل ۱ نشان داده شده است و همچنین با روش سطح پاسخ به صورت نمودار سه بعدی به ترتیب در شکل‌های ۲ (الف) و (ب) نشان داده شده است. میزان فنول کل جوانه‌ی گندم تخمیرشده در محدوده ۴-۱/۶ میلی‌گرم معادل گالیک اسید در گرم قرار دارد.




**شکل ۱- مقایسه اثر نوع میکروارگانیسم بر میزان فنول کل جوانه گندم طی تخمیر در pH ها و زمان‌های مختلف تخمیر**

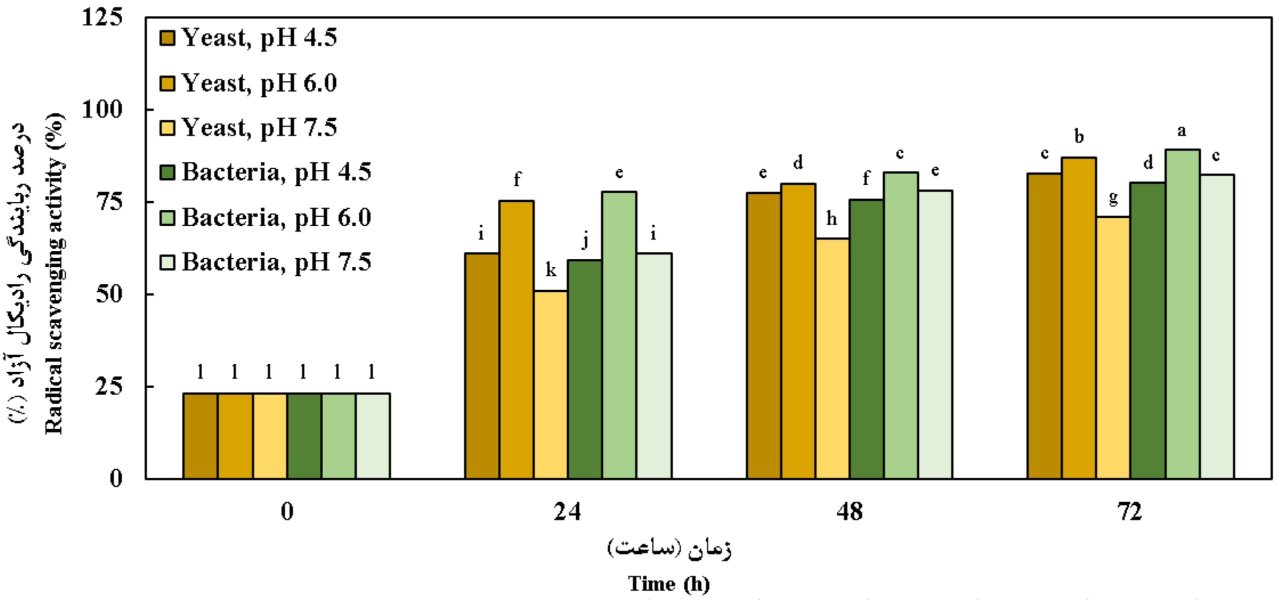
**Fig. 1- Comparison of the effect of the type of microorganism on the amount of total phenol in wheat germ during fermentation at different pHs and fermentation times**




**شکل ۲- اثر pH و زمان بر میزان فنول کل جوانه گندم تخمیر شده توسط (الف) مخمر و (ب) باکتری**

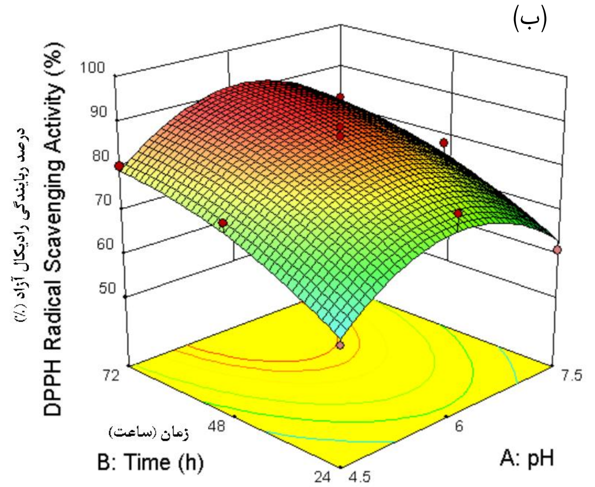
**Fig. 2- Effect of pH and time on total phenolic content of wheat germ fermented by (a) yeast and (b) bacteria**

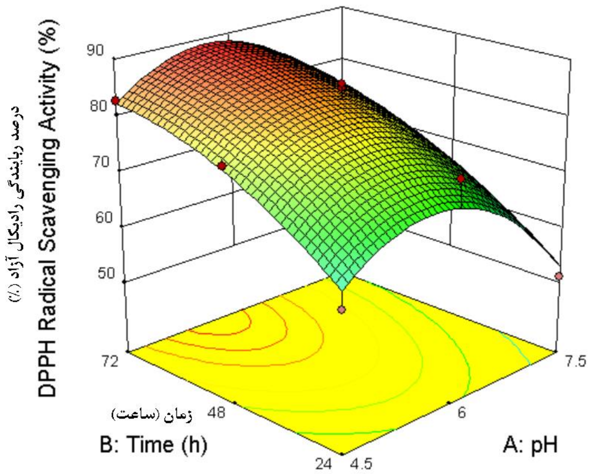
در سطوح یکسان pH، با افزایش زمان تخمیر با هر دو نوع میکروارگانیسم مخمر و باکتری تا زمان ۴۸ ساعت میزان ترکیبات فنولی به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.05$) پس از این زمان (تا انتهای زمان تخمیر، ۷۲ ساعت) میزان فنول کل تقریبا ثابت ماند و در بعضی نقاط کاهش یافت که می‌تواند به دلیل فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز باشد. در ارتباط با مخمر، بالاترین میزان فنول کل مربوط به زمان ۴۸ ساعت و pH معادل ۶/۰ بود. در نهایت در مقایسه با جوانه‌ی گندم خام (جوانه‌ی گندم تخمیر نشده) تخمیر باعث افزایش معنی دار در میزان فنول کل شد. ژنگ و همکاران (Zheng *et al.*, 2016) گزارش کردند که تغییرات فلاونوئید در تخمیر جوانه‌ی گندم با مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* باعث شد که میزان فلاونوئید در بالاترین سطح ۳/۶ میلی‌گرم گالیک اسید برگرم قرار گیرد. طبق مطالعات آن‌ها بعد از ۴۸ ساعت فلاونوئید کاهش پیدا کرد و به ۱/۵ میلی‌گرم گالیک اسید برگرم رسید (Zheng *et al.*, 2016). در زمان تخمیر ۴۸ ساعت میزان فنول کل جوانه‌ی گندم تخمیر شده با باکتری به طور معنی داری بیشتر از جوانه گندم تخمیر شده با مخمر بود. بیشترین میزان فنول کل جوانه‌ی گندم در pH معادل ۶/۰ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت توسط باکتری مشاهده شد. لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2017) اثر تخمیر با باکتری *لاکتوباسیلوس ساتیلیس* را بر جوانه‌ی گندم خام بررسی نمودند. آن‌ها میزان فنول کل در جوانه‌ی گندم خام را ۱۰/۵۵ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم گزارش کردند که بعد از تخمیر در ۷۲ ساعت به بالاترین میزان خود (۲۶/۰۲ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم) رسید (Liu *et al.*, 2017). ساندهو و همکاران (Sandhu *et al.*, 2016) تخمیر جوانه‌ی گندم را با *آسپرژیلوس* انجام دادند و فنول کل جوانه گندم را ۱/۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم گزارش کردند که بعد از تخمیر و از روز دوم میزان آن افزایش یافت و به ۳/۵۴ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم رسید، آن‌ها به این نتیجه رسیدند میزان تغییرات ترکیبات فنولی وابسته به نوع میکروارگانیسم، بستره و شرایط محیطی متغیر است (Sandhu *et al.*, 2016). در باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* آنزیم‌هایی از قبیل بتاگلوکوزیداز، کربوکسیلاز، آلفاگلوکوزیداز و فسفوکینازها گسترده است که در طی تخمیر بیشتر فیبرهای دیواره سلولی مانند سلولز، همی سلولز و پنتوزان‌ها را تخریب می‌کنند و در نتیجه پلی فنول‌های اتصال یافته به همی‌سلولز آزاد گشته و باعث افزایش پلی‌فنول می‌شوند. در این مطالعه گزارش شد که فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها مسئول افزایش پلی‌فنول بوده و همچنین در رابطه با تاثیر pH بر میزان ترکیبات فنولی هور و همکاران (Hur *et al.*, 2014) به این نتیجه رسیدند که میزان تغییرات ترکیبات فنولی و pH به نوع میکروارگانیسم مورد استفاده بستگی دارد که در مورد باکتری اسید لاکتیک محیط اسیدی بوده و بنابراین امکان کم شدن فنول وجود داشت (Hur *et al.*, 2014).




**شکل ۳- مقایسه اثر نوع میکروارگانیسم بر درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH جوانه گندم طی تخمیر در pH ها و زمان‌های مختلف تخمیر**

**Fig. 3- Comparison of the effect of the type of microorganism on the DPPH free radical scavenging percentage of wheat germ during fermentation at different pHs and fermentation times**




**شکل ٤- اثر pH و زمان بر درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH جوانه گندم تخمیر شده توسط (الف) مخمر و (ب) باکتری**

**Fig. 4- Effect of pH and time on DPPH free radical scavenging percentage of wheat germ fermented by (a) yeast and (b) bacteria**

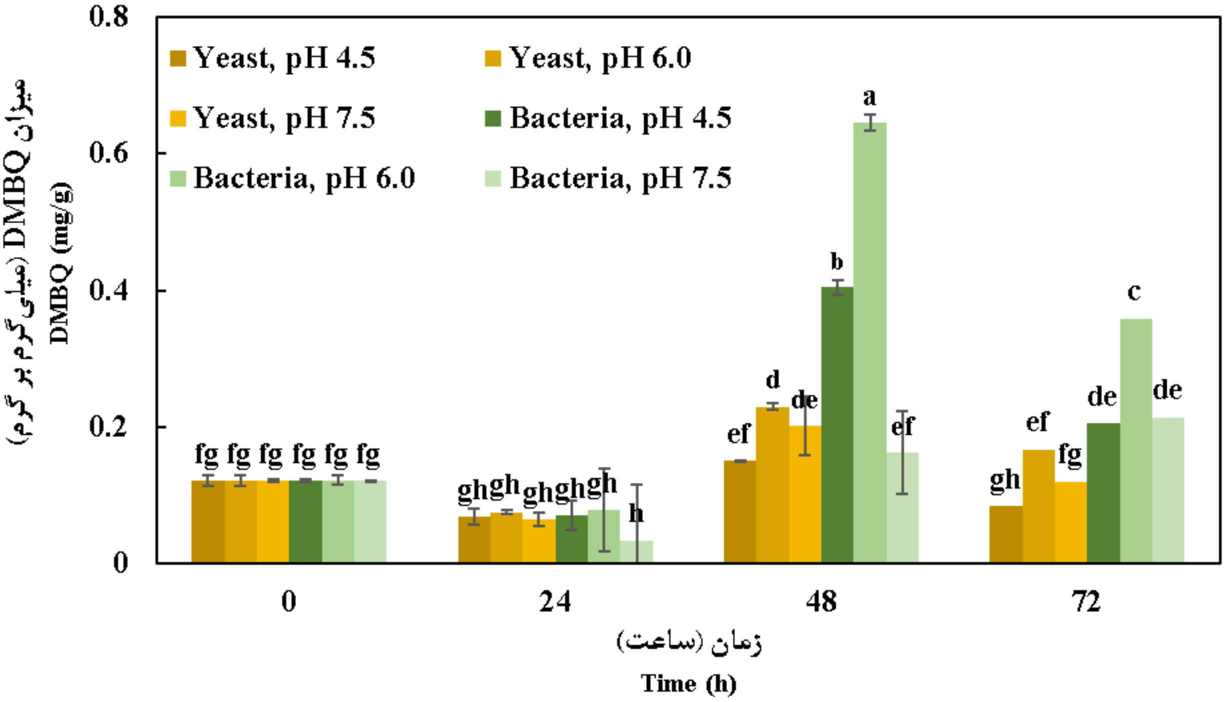
### ربایندگی رادیکال آزاد DPPH

تغییرات درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH در جوانه گندم تخمیر شده توسط مخمر و باکتری در شکل ۳ نشان داده شده است و همچنین نمودارهای سه بعدی حاصل از روش سطح پاسخ به ترتیب در شکل‌های ۴ (الف) و (ب) نشان داده شده است. مقادیر حداقل و حداکثر ربایندگی رادیکال آزاد DPPH جوانه گندم تخمیر شده به ترتیب ۵۱/۰۰ و ۸۹/۲۰ درصد می‌باشد.

در سطوح یکسان pH با افزایش زمان تخمیر درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH به طور معنی‌داری افزایش یافت. بالاترین درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH مربوط به pH معادل ۶/۰ در زمان ۷۲ ساعت برای مخمر و باکتری بود. در نهایت در مقایسه با جوانه‌ی گندم خام (جوانه‌ی گندم تخمیر نشده) تخمیر باعث افزایش معنی‌دار درصد ربایندگی رادیکال آزاد DPPH شد. مزایای سلامتی بخش مانند اثرات ضد سرطانی ترکیبات زیست فعال به ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها بستگی دارد (Zhang *et al.*, 2017). لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2017) در پژوهش خود تخمیر جوانه‌ی گندم با *لاکتوباسیلوس سابتیلس* را بررسی کردند و در رابطه با فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش کردند که در ساعات مختلف بین زمان صفر تا ۷۲ ساعت تغییر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاملا مشخص بود و از۱۰ درصد در جوانه‌ی خام به حدودا ۸۷ درصد در نمونه‌ی تخمیر شده با باکتری رسید (Liu *et al.*, 2017). ریزلو و همکاران (Rizzello *et al.*, 2013) گزارش کردند که تخمیر جوانه‌ی گندم توسط دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* LB1 و *لاکتوباسیلوس روسی*LB5 باعث افزایش ۳۳ درصدی در مقایسه با جوانه‌ی گندم خام شد (Rizzello *et al.*, 2013). بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی به دلیل هم‌افزایی پلی‌فنول‌ها و پپتیدهای آزاد شده در اثر تخمیر است (Liu *et al.*, 2017). براساس نتایج به دست آمده در سال‌های اخیربیان این نکته حائز اهمیت است که تخمیر تأثیر مثبت خود را بر میزان ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی درغلات نشان داده است البته گونه‌ی میکروارگانیسم مورد استفاده بسیار مهم است چرا که آنزیم‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها متفاوت بوده و بر میزان ترکیبات زیست فعال بسیار تأثیرگذار است. بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی با تخمیر عمدتاً به دلیل افزایش ترکیبات فنولی و فلانوئیدها است که از طریق تاثیر آنزیم‌های تولید شده میکروارگانیسم‌ها است (Đorđević *et al.*, 2010).

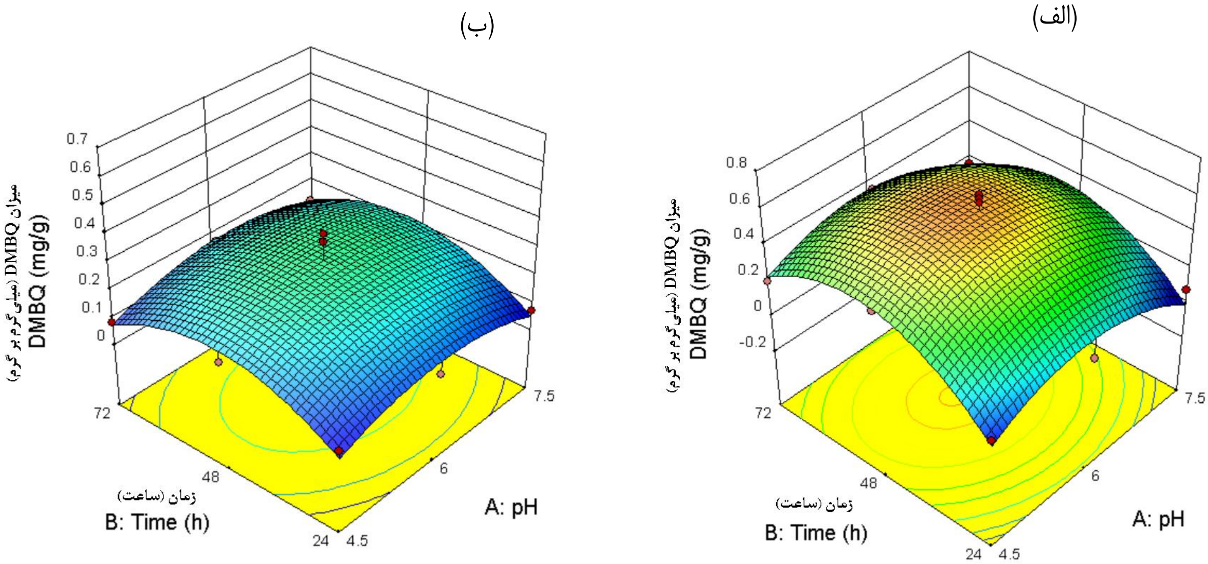
### میزان دی متوکسی بنزوکوئینون DMBQ

کوئینون‌ها یکی از ترکیبات زیست فعال موجود در جوانه‌ی گندم می‌باشند. متوکسی بنزوکوئینون و دی متوکسی بنزوکوئینون از جمله مشتقات کوئینون به حساب می‌آیند. در مطالعات متعددی در رابطه با نقش کوئینون و تاثیرات آن بر سلول‌های سرطانی بحث شده است. تغییرات میزان دی متوکسی بنزوکوئینون در جوانه‌ی گندم تخمیر شده توسط مخمر و باکتری در شکل ۵ نشان داده شده است و همچنین نمودار سه بعدی حاصل از روش سطح پاسخ در شکل‌های ۶ (الف) و (ب) نشان داده شده است. مقادیر حداقل و حداکثر میزان دی متوکسی بنزوکوئینون جوانه گندم تخمیرشده به ترتیب ۰/۱۰ mg/g و ۰/۶۰ بوده‌اند.




شکل ۵- مقایسه اثر نوع میکروارگانیسم بر میزان دی متوکسی بنزو کوئینون جوانه گندم طی تخمیر در pH ها و زمان های مختلف تخمیر

**Fig. 5- Comparison of the effect of the type of microorganism on the amount of dimethoxybenzoquinone in wheat germ during fermentation at different pHs and fermentation times**



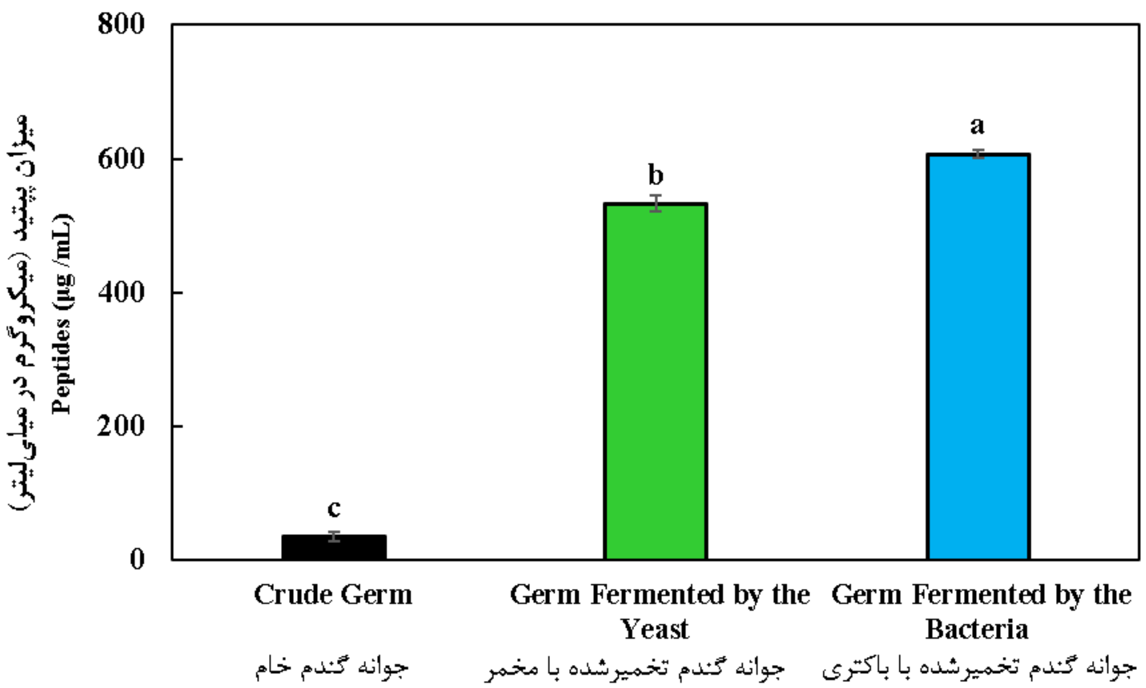

شکل ٦- اثرpH وزمان دی متوکسی بنزوکوئینون جوانه گندم تخمیرشده توسط (الف) مخمر و (ب) باکتری

**Fig. 6 - Effect of pH and time of dimethoxybenzoquinone on wheat germ fermented by (a) yeast and (b) bacteria**

نتایج نشان داد که در مورد تخمیر با هر دو نوع میکروارگانیسم مخمر و باکتری افزایش pH تا ۶/۰ و زمان تخمیر تا ۴۸ ساعت موجب افزایش تولید دی متوکسی بنزوکوئینون شد. همچنین برای هر دو مورد طبق نتایج بدست آمده با افزایش pH و زمان تخمیر روند تولید دی متوکسی بنزوکوئینون روندی نزولی داشت. ژنگ و همکاران در پژوهشی که انجام دادند در رابطه با بهینه‌یابی شرایط تخمیر جوانه‌ی گندم با مخمرساکارومایسس سرویزیه به این نتیجه رسیدند که میزان متوکسی بنزوکوئینون و دی متوکسی بنزوکوئینون بعد از تخمیر افزایش می‌یابد. این میزان در جوانه‌ی گندم خام نزدیک به ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم بود که بعد از تخمیر مجموع این دوکوئینون به ۲/۸ میلی‌گرم بر گرم رسید (Zheng *et al.*, 2016). میزان دی متوکسی بنزوکوئینون جوانه‌ی گندم تخمیر شده با باکتری به طوری معنی داری بیشتر از جوانه‌ی تخمیر شده با مخمر بود. بیشترین میزان دی متوکسی بنزوکوئینون برای جوانه‌ی گندم تخمیر شده توسط باکتری در زمان ۴۸ ساعت و سطح pH معادل ۶/۰ مشاهده شد. در پژوهشی دیگر ژنگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2015) گزارش دادند که میزان دی متوکسی بنزوکوئینون از ۳۳/۸ میکروگرم بر گرم در جوانه‌ی خام به ۱۸۱/۱ میکروگرم بر گرم افزایش داشت. ریزلو و همکاران (Rizzello *et al.*, 2013) نیز چنین بیان کردند که میزان دی متوکسی بنزوکوئینون از ۰/۱ میلی‌گرم بر گرم در جوانه‌ی گندم خام به ۰/۴ میلی‌گرم بر گرم در جوانه‌ی تخمیری رسید. در فرآیند تخمیر با باکتری و مخمر پیوندهای بتاگلوکوزیداز به دلیل وجود آنزیم بتاگلوکوزیداز موجود در آنها شکسته شده و میزان متوکسی‌بنزوکوئینون و دی‌متوکسی بنزوکوئینون افزایش می‌یابد. دو هیدروکوئینون توسط پرواکسیداز موجود در جوانه‌ی گندم نیز کاتالیز می‌شوند. آنزیم بتاگلوکوزیداز و پرواکسیداز عاملی مهم برای ایجاد این دو هیدروکوئینون می‌باشد.

### میزان پپتید در شرایط بهینه

میزان پپتید در جوانه‌ی گندم تخمیر شده و جوانه‌ی گندم خام (تخمیر نشده) در شکل ۷ نشان داده شده است. پپتیدهای زیست فعال در نتیجه‌ی هیدرولیز آنزیمی یا مراحل فرآیند مواد غذایی از جمله تخمیر، جوانه زنی و رسیدن محصول تولید می‌شوند ( Zhu *et al.*, 2006). براساس منابع، پپتیدهای زیست فعال عوامل بسیار مهم و موثر در فعالیت‌های زیستی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد سرطانی می‌باشند.



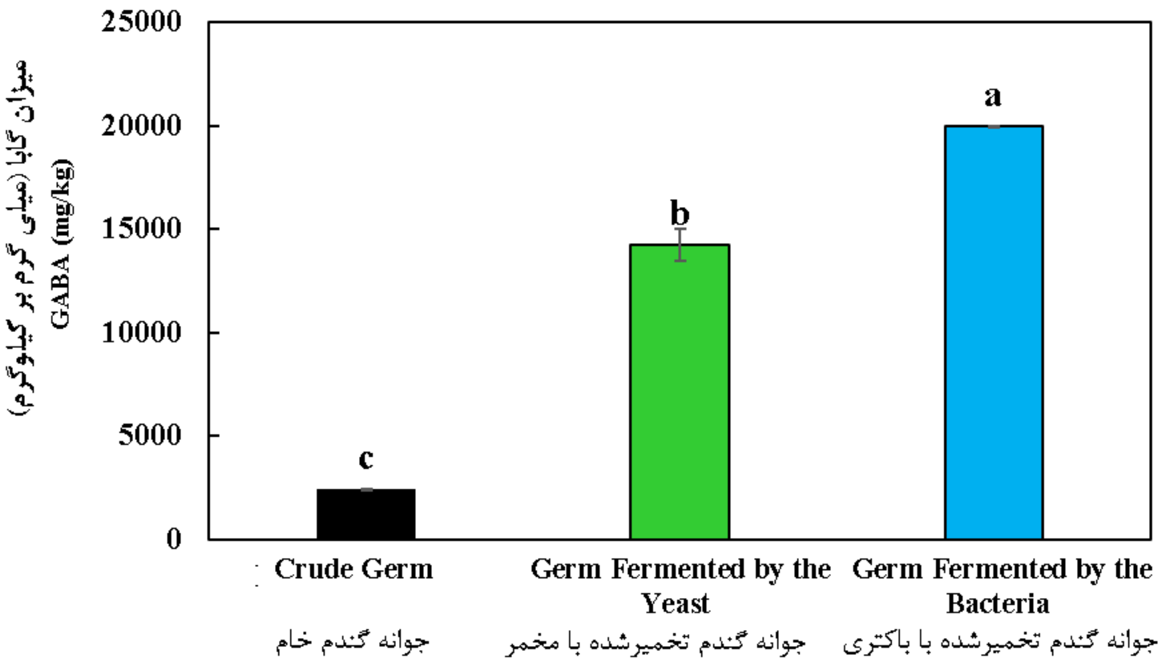

**شکل ۷- میزان پپتید در جوانه گندم خام و جوانه های گندم تخمیر شده**

**Fig. 7- The amount of peptide in raw wheat germ and fermented wheat germ**

نتایج این پژوهش نشان داد بخشی از فعالیت‌های زیستی عصاره‌ی جوانه‌ی گندم خام تخمیری می‌تواند ناشی از حضور پپتیدها باشد. بدین منظور میزان پپتیدهای زیست فعال در جوانه‌ی گندم خام و تخمیر شده (به وسیله‌ی باکتری و مخمر) اندازه‌گیری شد. در این پژوهش میزان پپتید در جوانه گندم خام (تخمیر نشده) ۳۵/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و بعد از تخمیر توسط مخمر میزان پپتید به ۵۳۲/۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در اثر تخمیر با باکتری به ۶۰۷/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید. میزان پپتید در جوانه‌ی گندم تخمیر شده به طور معنی داری بیشتر از جوانه‌ی گندم تخمیر نشده و میزان پپتید در جوانه‌ی گندم تخمیر شده با باکتری به طور معنی داری بیشتر از جوانه‌ی گندم تخمیر شده با مخمر بود. در گزارشی مشابه از لیو و همکاران (Liu *et al*., 2017) میزان پپتید نمونه‌ها در مرحله‌ی اولیه تخمیر (۰ تا ۴۸ ساعت) به طور مداوم افزایش یافت اما به دنبال آن (از ۴۸ تا ۷۲ ساعت) کاهش یافت (از ۴ درصد به ۲۹ درصد و سپس به ۲۵ درصد). پروتئیناز تولید شده توسط باکتری باسیلوس سابتیلیس می‌تواند پروتئین را هیدرولیز کرده و پپتیدها را تولید نماید (Liu *et al*., 2017). نیو و همکاران (Niu *et al*., 2013) نیز گزارش کردند میزان پپتید از زمان صفر تا ۴۸ ساعت بالاترین میزان را داشت و بعد از گذشت ۴۸ ساعت شروع به کاهش کرد.

### میزان گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) در شرایط بهینه

میزان گابا در شکل ۸ ارائه شده است. گاما آمینو بوتیریک اسید، اسیدآمینه آزاد چهار کربنی غیرپروتئینی است که به دلیل داشتن اثرات سلامت‌بخش آن از جمله ضدفشارخون، ضددیابت، ضدسرطان، کاهش چاقی، اثرات آرام‌بخش، کاهش احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی و بیماری آلزایمر حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش میزان گابا به‌دست آمده از جوانه‌ی گندم خام (تخمیر نشده) معادل ۲۴۲۱/۶۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود و در اثر تخمیر جوانه‌ی گندم با مخمر گابا به میزان معادل ۱۳۶۷۵/۶۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در تخمیر با باکتری به میزان ۱۹۹۸۳/۸۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید.




**شکل ۸- میزان گابا در جوانه گندم خام و جوانه های گندم تخمیر شده**

**Fig. 8- The amount of GABA in raw wheat sprouts and fermented wheat sprouts**

لازم به ذکر است میزان گابا در جوانه‌ی تخمیری دارای تفاوت معناداری با جوانه‌ی گندم خام است و همچنین در تخمیر با باکتری تفاوت معناداری به نسبت تخمیر با مخمر وجود دارد. در پژوهش انجام شده توسط ریزلو و همکاران (Rizzello *et al*., 2010) که طی تخمیر جوانه‌ی گندم با دو نوع باکتری اسید لاکتیک (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم LB1* و *لاکتوباسیوس روسی LB5*) روند افزایشی در میزان

گابا وجود داشت. آن‌ها میزان گابا در جوانه‌ی گندم خام را ۹۰۳ میلی‌گرم در کیلوگرم و در جوانه‌ی تخمیر شده ۲۰۴۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش دادند (Rizzello *et al.*, 2010). در این مطالعه نیز میزان گابا افزایش پیدا کرد اما در پژوهش حاضر افزایش بیشتری وجود دارد که ممکن است به دلیل تفاوت در نوع و سویه باکتری باشد.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه شرایط بهینه تخمیر جوانه گندم، تخمیر توسط باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1058 در pH برابر با ۶ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت بدست آمد. در اثر فرایند تخمیر میزان فنول کل، ربایندگی رادیکال آزاد DPPH، میزان دی متوکسی بنزو کوئینون، پپتید، گاما آمینوبوتیریک اسید نمونه‌ی جوانه‌ی گندم تخمیر شده توسط باکتری نسبت به جوانه‌ی خام بیشتر بود. در فرایند تخمیر جوانه‌ی گندم با افزایش pH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان ترکیبات فنولی کل و میزان دی متوکسی بنزوکوئینون ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت و همچنین در طول فرایند تخمیر جوانه‌ی گندم با افزایش زمان تخمیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش ولی میزان ترکیبات فنولی کل و میزان دی متوکسی بنزوکوئینون ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت.

## منابع


1. AACC. (2000). *Approved Methods of the AACC*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota. (Methods 08-01, 30-10, 44-19, 46-10).
2. Adedoyin, R.A., Afolabi, A., Adegoke, O.O., Akintomide, A.O., & Awotidebe, T.O. (2013). Relationship between socioeconomic status and metabolic syndrome among Nigerian adults. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, *7*(2), 91-94. https://doi.org/10.1016/j.dsx.2013.02.014
3. Babu, C.R., Ketanapalli, H., Beebi, S.K., & Kolluru, V.C. (2018). Wheat bran-composition and nutritional quality: a review. *Advanced Biotechnology Microbiology*, *9*(1), 1-7.
4. Donkor, O.N., Stojanovska, L., Ginn, P., Ashton, J., & Vasiljevic, T. (2012). Germinated grains–Sources of bioactive compounds. *Food Chemistry*, *135*(3), 950-959. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.058
5. Đorđević, T.M., Šiler-Marinković, S.S., & Dimitrijević-Branković, S.I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*, *119*(3), 957-963. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.049
6. Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.C., Choi, I., & Kim, G.B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, *160*, 346-356. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112
7. Karovičová, Z.K.J., & Kohajdova, J. (2007). Fermentation of cereals for specific purpose. *Journal of Food and Nutrition Researc*, *46*(2), 51-57. https://doi.org/10.4014/jmb.1004.04037
8. Katina, K., Juvonen, R., Laitila, A., Flander, L., Nordlund, E., Kariluoto, S., & Poutanen, K. (2012). Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. *Cereal Chemistry*, *89*(2), 126-134. https://doi.org/10.1094/CCHEM-08-11-0106
9. Kim, M.H., Jo, S.H., Ha, K.S., Song, J.H., Jang, H.D., & Kwon, Y.I. (2010). Antimicrobial activities of 1, 4-benzoquinones and wheat germ extract. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(8), 1204-1209.
10. Liu, F., Chen, Z., Shao, J., Wang, C., & Zhan, C. (2017). Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ. *Food Bioscience*, *20*, 141-148. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.10.002
11. Lu, Q., Bjørnstad, Å., Ren, Y., Asad, M. A., Xia, X., Chen, X., & Lillemo, M. (2012). Partial resistance to powdery mildew in German spring wheat 'Naxos' is based on multiple genes with stable effects in diverse environments. *Theoretical and Applied Genetics*, *125*, 297-309. https://doi.org/10.1007/s00122-012-1834-6
12. Niu, L.Y., Jiang, S.T., & Pan, L.J. (2013). Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, *50*, 53-61. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0318-z
13. Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R., & Gobbetti, M. (2011). Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chemistry*, *127*(3), 952-959. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.063
14. Rizzello, C. G., Mueller, T., Coda, R., Reipsch, F., Nionelli, L., Curiel, J. A., & Gobbetti, M. (2013). Synthesis of 2-methoxy benzoquinone and 2, 6-dimethoxybenzoquinone by selected lactic acid bacteria during sourdough fermentation of wheat germ. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-105

15. Rizzello, C.G., Nionelli, L., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2010). Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. *Food Chemistry*, *119*(3), 1079-1089. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.016
16. Sandhu, K.S., Punia, S., & Kaur, M. (2016). Effect of duration of solid state fermentation by *Aspergillus awamorinakazawa* on antioxidant properties of wheat cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, *71*, 323-328. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.008
17. Zhang, J. Y., Xiao, X., Dong, Y., Wu, J., Yao, F., & Zhou, X. H. (2015). Effect of fermented wheat germ extract with lactobacillus plantarum dy-1 on HT-29 cell proliferation and apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(9), 2449-2457. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00041
18. Zhang, X.Y., Chen, J., Li, X.L., Yi, K., Ye, Y., Liu, G., & Wang, Z.G. (2017). Dynamic changes in antioxidant activity and biochemical composition of tartary buckwheat leaves during Aspergillus niger fermentation. *Journal of Functional Foods*, *32*, 375-381. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.022
19. Zheng, Z. Y., Guo, X. N., Zhu, K. X., Peng, W., & Zhou, H.M. (2017). Artificial neural network–Genetic algorithm to optimize wheat germ fermentation condition: Application to the production of two anti-tumor benzoquinones. *Food Chemistry*, *227*, 264-270. https://doi.org/10.1039/C5RA27004A
20. Zheng, Z., Guo, X., Zhu, K., Peng, W., & Zhou, H. (2016). The optimization of the fermentation process of wheat germ for flavonoids and two benzoquinones using EKF-ANN and NSGA-II. *RSC Advances*, *6*(59), 53821-53829. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.077
21. Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, *41*(6), 1296-1302. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.029